

**ABSTRACT**

**Antiosteoporotic Activity of Ethanol 96 % Extract  
Abelmoschus Manihot L. Medic Leaves  
In MC3T3-E1 Preosteoblast Cells In Vitro**

Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and structural deterioration of bone tissue. Estrogen deficiency causes loss of bone mineral density which affects osteoporosis. Phytoestrogen was an potential alternative of estrogen that has minimum side effects. Many edible plants contain of phytoestrogens that are believed to promote bone health. Abelmoschus manihot (L.) Medik is one of the plants in Indonesia which suspected contains estrogen like substance and potential to prevent osteoporosis. The aim of this research is to determine whether the Abelmoschus manihot (L.) Medik leaves has the potential to increase bone formation at in vitro assays in preosteoblast cell line MC3T3-E1. Abelmoschus manihot (L.) leaves is extracted with ethanol 96 %. Identified with GC-MS and tested through in silico study in ER $\beta$  to know it's affinity, and compared it to estrogens affinity. The results of in vitro study showed that phytoestrogen from ethanol 96 % extract is able to increase bone formation by increasing ALP activity that is known from CLSM. Through correlation analysis of in vitro results, TIC GC-MS, and in silico results.

**Keywords** : Abelmoschus manihot L. Medic, preosteoblast MC3T3-E1 cell, alkaline phosphatase

**RINGKASAN**

**AKTIVITAS ANTIOSTEOPOROSIS EKSTRAK  
ETANOL 96 % DAUN *Abelmoschus manihot* L. Medik  
PADA SEL PREOSTEOBLAS MC3T3-E1 IN VITRO**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 96 % dari daun *Abelmoschus manihot* L. Medik berperan sebagai antiosteoporosis yaitu dapat mencegah resorpsi tulang dan meningkatkan terjadinya bone formation secara in vitro. Peningkatan bone formation erat kaitannya dengan diferensiasi sel preosteoblas menjadi sel osteoblas yaitu sel yang membentuk tulang.

Identifikasi senyawa pada ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik dengan menggunakan metode KLT dan pengujian GC-MS. Senyawa-senyawa yang terdeteksi dalam GC-MS selanjutnya dilakukan pengujian secara in silico.

Studi in silico senyawa kandungan daun *A. manihot* L. Medik dilakukan untuk mengetahui afinitas senyawa kandungan tersebut terhadap reseptor estrogen, dan dibandingkan dengan afinitas estrogen terhadap reseptor estrogen. Estrogen yang digunakan sebagai pembanding adalah  $17\beta$ -estradiol dan reseptor estrogen yang digunakan untuk docking adalah  $ER\beta$ . Perhitungan afinitas dengan metode docking, ligan  $17\beta$ -estradiol yang digunakan adalah ligan EST\_600 A dan  $ER\beta$  yang digunakan adalah protein 3OLS A. Perhitungan afinitas ligan EST\_600 A terhadap protein 3OLS A pada cavity 1 dapat diketahui melalui data analisis rerank score. Hasil studi yang didapatkan dari pengujian in silico dapat digunakan sebagai pelengkap setelah dikorelasikan dengan TIC GC-MS dan hasil studi in vitro.

Ekstrak ekstrak Etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik dibuat dalam beberapa macam dosis yaitu 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 40 ppm. Masing-masing larutan sampel tersebut diberikan pada sel preosteoblas MC3T3-E1 yang sudah dikultur dalam microplate 24-well dilakukan tiga kali replikasi. Preparasi sel dilakukan setelah inkubasi dengan proses fiksasi dilanjutkan pemberian antibodi primer maupun sekunder, untuk kemudian diamati dengan CLSM pada panjang gelombang 488 nm.

Hasil identifikasi KLT senyawa dalam ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik menggunakan eluen butanol : asam asetat glasial : air (4 : 1 : 5) dengan pereaksi penampak noda uap ammonia dan sitrat borat menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid. Pengujian Ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (6 : 4) dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd sulfat menunjukkan adanya golongan senyawa terpenoid.

Identifikasi GC-MS pada ekstrak etanol 96 % daun *A. manihot* L. Medik menunjukkan senyawa terpenoid dan asam lemak. Pada ekstrak etanol 96 % terdeteksi senyawa dengan % area 78.17 % yaitu 2-propenoic acid, 3-phenyl, 2-penhylethyl ester ; 1,33 % 9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z) ; 0,91 % Phytol ; 0,28 % 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z) ; 0,27 % Neophytadiene ; 0,25 % 9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z) ; 0,02 % Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-.

Hasil pengujian *in silico* senyawa 17 $\beta$ -Estradiol sebagai kontrol positif menunjukkan afinitas dengan ER $\beta$  dengan nilai RS -93,9781. Senyawa pada ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik yang teridentifikasi

GC-MS menunjukkan nilai RS -89.8199 yaitu 2-propenoic acid, 3-phenyl, 2-phenylethyl ester ; RS -89,5932 yaitu 9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z) ; RS -86,0529 yaitu 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z) ; RS -84,1753 yaitu Phytol ; RS -80,7686 yaitu 9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z) ; RS -76,8046 yaitu Neophytadiene ; RS -55,4782 yaitu Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-. Senyawa hasil derivatisasi ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik yang teridentifikasi GC-MS menunjukkan nilai RS -59,43 yaitu Beta-sitosterol trimethylsilyl ether.

Hasil pengujian *in vitro* pada ekstrak etanol 96 % dengan dosis 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 40 ppm menunjukkan aktivitas ALP lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah media kultur dan sel preosteoblas tanpa perlakuan dan dilakukan replikasi tiga kali. Kontrol positif yaitu  $17\beta$ -Estradiol dengan dosis 0,00272 ppm dilakukan tiga kali replikasi, hasilnya menunjukkan adanya aktivitas ALP yaitu penanda diferensiasi sel preosteoblas.

Melalui analisis korelasi hasil uji *in vitro*, GC-MS dan hasil studi *in silico*, dapat disimpulkan senyawa dalam ekstrak etanol 96 % daun *Abelmoschus manihot* L. Medik merupakan estrogen like substance yang berperan dalam pembentukan tulang dengan mekanisme peningkatan runx-2 dan osx yang menginduksi diferensiasi sel preosteoblas MC3T3-E1. Pada GC-MS menunjukkan 2-propenoic acid, 3-phenyl, 2-phenylethyl ester merupakan senyawa dengan kadar paling tinggi pada ekstrak etanol 96 % nilai rerank score hasil uji *in silico* menunjukkan nilai mendekati rerank score  $17\beta$ -estradiol.